

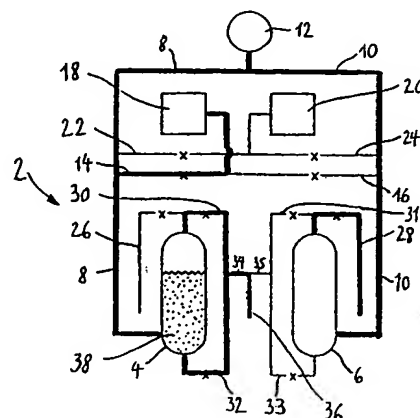
(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : C12M 1/34, 1/12		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/34433
		(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:	15. Juni 2000 (15.06.00)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/09422		(81) Bestimmungsstaaten: AE, AL, AM, AT, AT (Ge- brauchsmuster), AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE (Gebrauchsmuster), DK, DK (Gebrauchsmuster), EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 2. Dezember 1999 (02.12.99)			
(30) Prioritätsdaten: 198 56 136.9 4. Dezember 1998 (04.12.98) DE			
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): INSTITUT PASTEUR [FR/FR]; 25, rue du Dr. Roux, F-75724 Paris Cedex 15 (FR).			
(71)(72) Anmelder und Erfinder: MUTZEL, Rupert [DE/DE]; An der Steig 19, D-78464 Konstanz (DE).			
(72) Erfinder; und			
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): MARLIERE, Philippe [FR/FR]; 2, Allée Saint Martin, F-91450 Etolles (FR).			
(74) Anwalt: VOSSIUS & PARTNER; Siebertstrasse 4, D-81675 München (DE).			
		Veröffentlicht Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.	

(54) Title: METHOD AND DEVICE FOR SELECTING ACCELERATED PROLIFERATION OF LIVING CELLS IN SUSPENSION

(54) Bezeichnung: VERFAHREN UND VORRICHTUNG ZUR SELEKTION BESCHLEUNIGTER PROLIFERATION LEBENDER
ZELLEN IN SUSPENSION

(57) Abstract

The invention relates to a method and a device for selecting accelerated proliferation of living cells in suspension. The inventive culture apparatus (2) enables cells to proliferate in suspension over unlimited periods. Natural selection results in the accumulation of genetic variants which are increasingly better adapted to the chosen culture conditions. The organisms used can be prokaryotic or eukaryotic. The organisms used can be naturally occurring organisms or genetically modified. The inventive culture apparatus is also suitable for using constant, periodical or conditional culture conditions. The physical and chemical characteristics of the culture media used can be chosen by the user. The requirement that a population of cells proliferate exclusively in suspension in continuous culture conditions is satisfied by the periodical transfer of the organism suspension from a first culture vessel to a second culture vessel. After the transfer, the first culture vessel is subjected to a sterilising treatment and the sterilising agent is optionally neutralised, so that the first culture vessel is ready for the culture to be transferred back from the second culture vessel. The second culture vessel is then sterilised and neutralised.



(57) Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren und eine Vorrichtung zur Selektion beschleunigter Proliferation lebender Zellen in Suspension. Die erfindungsgemäße Kulturapparatur (2) ermöglicht die Proliferation von Zellen in Suspension über unbegrenzte Zeiträume. Durch die natürliche Selektion werden genetische Varianten angereichert, die zunehmend besser an die gewählten Kulturbedingungen angepasst sind. Dabei können die verwendeten Organismen prokaryontisch oder eukaryontisch sein. Darüber hinaus können die verwendeten Organismen natürlich vorkommend oder genetisch verändert sein. Die erfindungsgemäße Kulturapparatur ist ferner zur Verwendung konstanter, periodischer oder konditionaler Kulturbedingungen geeignet. Physikalische und chemische Charakteristika der benutzten Kulturmedien können vom Benutzer gewählt werden. Die Anforderung, daß eine Population von Zellen unter kontinuierlichen Kulturbedingungen ausschließlich in Suspension profiliert, wird durch periodische Überführung der Organismensuspension aus einem ersten Kulturgefäß in ein zweites Kulturgefäß erfüllt. Nach der Überführung wird das erste Kulturgefäß einer sterilisierenden Behandlung unterzogen, das sterilisierende Agens gegebenenfalls neutralisiert, so daß dann das erste Kulturgefäß für die Rücküberführung der Kultur aus dem zweiten Kulturgefäß bereit ist. Anschließend kann das zweite Kulturgefäß sterilisiert und neutralisiert werden.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

**Verfahren und Vorrichtung zur Selektion beschleunigter
Proliferation lebender Zellen in Suspension**

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren sowie eine Vorrichtung zur Selektion beschleunigter Proliferation lebender Zellen in Suspension.

Herkömmlicherweise wird zwischen seriellen und kontinuierlichen Kulturmethoden unterschieden. Bei der Technik der seriellen Kultur werden Kulturgefäße mit sterilem Wachstumsmedium mit einer Fraktion einer Kultur beimpft, die unter den gleichen Wachstumsbedingungen angezogen wurde. Dieser Zyklus wird wiederholt, wenn die neue Kultur gewachsen ist (Lenski, R.E. und Travisano, M. (1994): Dynamics of adaption and

1 diversification: A 10,000-generation experiment with bacterial
populations. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 6808-6814). Die in
der Literatur beschriebenen Experimente zur Proliferation
5 mikrobieller Organismen über die längsten Zeiträume wurden mit
dieser Methode durchgeführt (Lenski und Travisano, a.a.O.).
Bei kontinuierlichen Kulturmethode (Dijkuizen, D.E. (1993):
Chemostats used for studying natural selection and adaptive
evolution. Meth. Enzymol. 224, 613-631), wird eine Kultur kon-
10 tinuierlich nach einem vorgewählten Regime mit frischem
Wachstumsmedium verdünnt. In der Literatur sind solche Experi-
mente nur von begrenzter Dauer beschrieben (Dijkuizen,
a.a.O.).

15 Die vorstehend beschriebenen herkömmlichen Techniken haben
insbesondere den Nachteil, daß bisher kein Verfahren zur kon-
tinuierlichen Kultur beschrieben wurde, das die permanente
Proliferation von Organismen in Suspension gewährleistet. Alle
20 beschriebenen Apparaturen selektionieren verdünnungsresistente
(statische) Varianten, welche innere Oberflächen der Apparatur
besiedeln (Chao, L. and Ramsdell, G. (1985): The effects of
wall populations on coexistence of bacteria in the liquid
25 phase of chemostat cultures. J. Gen. Microbiol. 131, 1229-
1236). Diese Varianten bilden eine Subpopulation, die den
adaptiven Zwängen entkommt, die auf die Organismen in Suspen-
sion wirken. Kontinuierliche Kulturen mit konstanter Zell-
30 dichte, wie z.B. Turbidostat sind besonders anfällig für eine
Invasion durch verdünnungsresistente Varianten und können nur
über relativ kurze Zeiträume (etwa 200 Generationen) durchge-
führt werden. Die Literatur beschreibt diese Schwierigkeiten,
hat aber bisher nur untaugliche Lösungsmöglichkeiten ange-
35 boten. Aus diesem Grunde werden derartige Verfahren für wis-
senschaftliche und industrielle Ziele praktisch nicht ange-
wendet, obwohl ihr Potential sehr früh erkannt wurde (Monod,

1 J. (1950): La technique de la culture continue. Théorie et
applications. Ann. Inst. Pasteur 79, 390-410; Novick, A. and
Szilard, L. (1950): Description of the chemostat. Science 112,
5 715-716). Die serielle Kultur, die man mit der periodischen
Erneuerung der Kulturapparatur - in diesem Fall eines ein-
fachen Kulturgefäßes - beschreiben kann, vermeidet die Inva-
sion mit solchen verdünnungsresistenten Varianten. Sie ist
jedoch arbeitsaufwendig, d.h. personalintensiv und durch
10 wiederholte Manipulation unter Bedingungen, die absolute Ste-
rilität erfordern, kontaminationsanfällig (Lenski und
Travisano, a.a.O.). Robotisierung der seriellen Kultur in
einer sterilen Umgebung könnte diese Risiken reduzieren. Sie
würde jedoch mit einem großen Aufwand an Kulturgefäßen erkaufte
15 und wäre durch die Aufrechterhaltung der mechanischen
Präzision des Roboters und die Aufrechterhaltung der sterilen
Umgebung limitiert.

20 Es ist daher eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein ver-
bessertes Verfahren und eine verbesserte Vorrichtung zur Se-
lektion beschleunigter Proliferation lebender Zellen in Sus-
pension zur Verfügung zu stellen. Diese Aufgabe wird mit den
25 Merkmalen der Patentansprüche gelöst.

Dabei geht die Erfindung von den Grundgedanken aus, daß die
Vorrichtung eine Suspension von Zellen dauernd in Prolifera-
30 tion hält. In keinem Teil der Apparatur darf eine verdün-
nungsresistente Variante akkumulieren. Ihre Funktion wird
durch die Steuerung von Flüssigkeitsströmen (Fluidics) gewähr-
leistet. Unter der Voraussetzung, daß die regelmäßige
Nachlieferung von Flüssigkeiten, wie z.B. Nährmedien und
35 Waschlösungen, und eine kontinuierliche Versorgung mit ste-
rilen Gasen, wie z.B. Luft gewährleistet wird, muß die Appa-
ratur über unbegrenzte Zeitdauer autonom arbeiten. Verschie-

1 dene Kulturregime, wie z.B. Chemostat oder Turbidostat, können
angewendet werden. Bei Bedarf können bestimmte Bestandteile
von Zellen durch die Wirkung geeigneter Lösungen abgetrennt
5 oder isoliert werden. Bei Bedarf können mehrere der Appara-
turen so miteinander verbunden werden, daß der Inhalt oder ein
Teil des Inhalts einer Apparatur in eine andere überführt wer-
den kann.

10 Konkret wird die Anforderung, daß eine Population von Zellen
unter kontinuierlichen Kulturbedingungen ausschließlich in
Suspension profiliert, durch vorzugsweise periodische Über-
führung der Organismensuspension aus einem ersten Kulturgefäß
15 in ein zweites Kulturgefäß erfüllt. Nach der Überführung wird
das erste Kulturgefäß einer sterilisierenden Behandlung unter-
zogen, das sterilisierende Agens gegebenenfalls neutralisiert,
und das erste Kulturgefäß ist dann wiederum bereit für die
Rücküberführung der Kultur aus dem zweiten Kulturgefäß, das
20 anschließend der Sterilisation und Neutralisation unterzogen
wird. Dieser Ablauf stellt dabei sicher, daß (i) die Popula-
tion von Organismen in Suspension zu jedem Zeitpunkt erhalten
bleibt und (ii) alle verdünnungsresistenten Varianten in ir-
25 gend einem Teil der Apparatur während jedem der Zyklen zer-
stört werden.

Das Verfahren der alternierenden Sterilisierung der Kulturge-
30 fäße selektioniert vorzugsweise direkt und regelmäßig gegen
variante Organismen, die Oberflächen in der Apparatur besie-
deln und verhindert die Proliferation und Adaption einer sta-
tischen, verdünnungsresistenten Population. Jede Vorrichtung
zur kontinuierlichen Kultur von Organismen kann als Apparatur
35 betrachtet werden, in der die natürliche Selektion Mutanten
bevorzugt, die der Verdünnung widerstehen. Das beschriebene
Verfahren bietet der kultivierten Population als einzige

1 Möglichkeit durch eine Erhöhung der Proliferationsrate in Sus-
pension der Verdünnung zu widerstehen. Im Unterschied zu einem
Fermentationsverfahren beschreibt die Erfindung ein Verfahren
5 der automatisierten Genetik, das gleichzeitig statische Vari-
anten gegenselektioniert und dynamische Varianten bevorzugt,
die immer besser an die Kulturbedingungen angepaßt sind.

10 Somit hat die vorliegende Erfindung gegenüber dem Stand der
Technik insbesondere den Vorteil, daß ein Regime konstanter
Zelldichte (Turbidostat) über unbegrenzte Zeiträume auf-
rechterhalten werden kann und daß die Wachstumsrate natürlich
15 vorkommender oder gentechnisch veränderter Zellen erhöht wer-
den kann. Ein Beispiel für industrielle Anwendungen ist die
Anreicherung natürlicher Varianten, die ein chemisches Produkt
(wie z.B. ein Zwischenprodukt chemischer Synthese oder ein Um-
weltgift) metabolisieren können. Ein weiterer Fall wäre die
20 Verbesserung eines Enzyms oder eines Stoffwechselweges: wenn
die Umwandlung eines Substrats in ein Produkt der limitierende
Schritt im Stoffwechsel einer Zelle ist und die Zelle mit die-
sem Substrat im Überschuß versorgt werden kann, so wird die
kontinuierliche Kultur unter den beschriebenen Bedingungen zu
25 einer Zunahme der Wachstumsrate führen, die aus einer erhöhten
Umsatzrate des Substrats resultiert, und diese erhöhte Um-
satzrate resultiert aus der Fixierung von aufeinanderfolgenden
Mutationen in dem Gen oder den Genen für die Enzyme, die für
30 den zu leistenden Umsatz des Substrats der Selektion unter-
liegen.

Ein weiterer Vorteil der vorliegenden Erfindung ist, daß
mehrere verschiedene Wachstumsmedien der Organismensuspension
35 durch die Apparatur zugeführt werden können. Dies erlaubt,
vielfache oder alternierende Adaption durchzuführen und die
metabolische Kapazität der kultivierten Organismen zu diversifi-

1 fizieren. Eine vorgewählte Zelldichte kann von anderen Vari-
ablen als der Zufuhr frischen Mediums abhängig gemacht werden.
Das Erreichen dieser Dichte kann die Wirkung chemischer und
5 physikalischer Agenzien konditionieren, deren Toxizität derart
eingestellt ist, daß die Population der Organismen ständig an
ihrer Toleranzgrenze ist oder daß zunehmend resistente Varian-
ten selektioniert werden. Zudem können durch die Zufuhr von
Detergenzien oder Lösungsmitteln bestimmte Bestandteile von
10 Zellen extrahiert werden. Insbesondere können genetisches Ma-
terial wie Plasmide oder Viren automatisch extrahiert werden,
wobei die Wirtszellen zerstört werden. Auf der anderen Seite
können bestimmte Agenzien zugeführt werden, die die Zellen
15 kompetent für genetische Transformation oder Infektion mit
natürlichen oder synthetisch hergestellten Nucleinsäuren ma-
chen. Dieses genetische Material kann dann in die Population
eingeführt werden. Ganz allgemein können zwei oder mehrere Ap-
paraturen miteinander verbunden werden. Damit können verschie-
20 dene Organismen automatisch in Kontakt gebracht werden und es
können automatisch verschiedenste genetische Materialien, wie
z.B. konjugative Episomen, Phagen, Transposons, usw. einge-
führt werden.

25 Die vorliegende Erfindung wird im folgenden anhand einer
bevorzugten Ausführungsform beispielhaft unter Bezugnahme auf
die Zeichnungen beschrieben. Darin zeigen:

30 Fig. 1 eine erfindungsgemäße Vorrichtung zur Selektion
beschleunigter Proliferation lebender Zellen in Sus-
pension in einer Ausgangsposition, in der sich die
Zellsuspensionen in einem ersten Kulturgefäß befin-
35 det;

Fig. 2 die Vorrichtung von Fig. 1, bei der sich die Zell-
suspension in einem zweiten Kulturgefäß befindet;

1 Fig. 3 die Vorrichtung von Fig. 2, wobei das erste Kultur-
gefäß ein sterilisierendes Agens aufweist;
Fig. 4 die Sterilisierung einzelner Leitungsabschnitte;
5 Fig. 5 die Vorrichtung beim Entfernen des sterilisierenden
Agens aus dem ersten Kulturgefäß sowie den dazugehö-
rigen Leitungsabschnitten;
Fig. 6-8 Schritte zur Entfernung und Neutralisierung von
Resten des sterilisierenden Agens aus dem ersten
10 Kulturgefäß und den dazugehörigen Leitungsabschnit-
ten mit einer Waschlösung;
Fig. 9 die Vorrichtung von Fig. 3, bei der das erste Kul-
turgefäß und die dazugehörigen Leitungsabschnitte
sterilisiert und neutralisiert sind; und
15 Fig. 10-16 die entsprechend umgekehrte Vorgehensweise zur Über-
führung der Kultur aus dem zweiten Kulturgefäß in
das erste Kulturgefäß.

20 Die in den Figuren 1 bis 16 dargestellte Vorrichtung zur Se-
lektion beschleunigter Proliferation lebender Zellen in Sus-
pension kann auch als Kulturapparatur 2 bezeichnet werden. Die
Kulturapparatur 2 ermöglicht die Proliferation von Zellen in
25 Suspension über unbegrenzte Zeiträume. Durch die natürliche
Selektion werden genetische Varianten angereichert, die
zunehmend besser an die gewählten Kulturbedingungen angepaßt
sind. Die verwendeten Organismen können prokaryontisch oder
eukaryontisch sein. Ferner können die verwendeten Organismen
30 natürlich vorkommend oder genetisch verändert sein. Konstante
(Kubitschek, H.E. (1970): Introduction to research with
continuous cultures. Prentice-Hall; Pirt, S.J. (1975):
Principles of microbe and cell cultivation. Blackwell), peri-
odische (Pirt, a.a.O.) oder konditionale (Bryson, V. (1952):
35 The turbidostatic selector - a device for automated isolation
of bacterial variants. Science 116, 48-51; Fraleigh, S.P.,

1 Bungay, H.R. and Clesceri, L.S. (1989): Continuous culture,
feedback and auxostats. TIBTech. 7, 159-164) Kulturbedingungen
können verwendet werden. Physikalische und chemische
5 Charakteristika der benutzten Kulturmedien können vom Benutzer
gewählt werden.

Der Aufbau und das Funktionsschema der Kulturapparatur 2 wird
nachstehend anhand der Figuren 1 bis 16 beschrieben. Die Kul-
10 turapparatur 2 weist im wesentlichen ein erstes Kulturgefäß 4
und ein zweites Kulturgefäß 6 auf. Die beiden Kulturgefäße 4
und 6 sind über Leitungen 8 bzw. 10, die vorzugsweise in den
unteren Bereich der Kulturgefäße 4 bzw. 6 münden, mit einer
15 unter Überdruck stehenden Gasversorgung 12 verbunden. Des
weiteren sind die Kulturgefäße 4 und 6 über Leitungen 14 und
16 jeweils mit einer ebenfalls unter Überdruck stehenden Medi-
umsquelle 18 verbunden. Die Leitungen 14 und 16 münden vor-
zugsweise von der Mediumsquelle 18 kommend jeweils in die Lei-
20 tungen 8 bzw. 10 zur Verbindung der Gasversorgung 12 mit den
beiden Kulturgefäßen 4 bzw. 6. Darüber hinaus ist eine unter
Überdruck stehende Quelle 20 für ein sterilisierendes Agens 21
(z.B. NaOH) vorgesehen, die mittels Leitungen 22 und 24 mit
25 den jeweiligen Kulturgefäßen 4 bzw. 6 in Verbindung steht.
Vorzugsweise münden die Leitungen 22 und 24 in die Leitungen 8
und 10, wie vorstehend für die Leitungen 14 und 16 beschrie-
ben.

30 An den Kulturgefäßen 4 und 6 ist ferner jeweils eine Abblaßlei-
tung 26 bzw. 28 vorgesehen, um überschüssiges sterilisierendes
Agens 21 bzw. Waschlösungen 19 während der Sterilisation und
Neutralisation des jeweiligen Kulturgefäßes 4 oder 6
35 abzuführen. Des weiteren sind Verbindungsleitungen 30, 31, 32
und 33 zwischen den beiden Kulturgefäßen 4 und 6 vorgesehen,
um die beiden Kulturgefäße 4 und 6 miteinander in Verbindung

1 zu bringen. Vorzugsweise weisen mindestens zwei der Ver-
bindungsleitungen einen gemeinsamen Abschnitt 34 und 35 auf,
an dem eine Abllaßleitung 36 vorgesehen ist, die der voll-
ständigen Entleerung eines der beiden Kulturgefäße 4 oder 6
5 oder der Entnahme der Kultur 38 oder eines Teils davon dient.

Zur Steuerung des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Selektion
beschleunigter Proliferation lebender Zellen in Suspension
10 sind ferner in den Leitungen oder Leitungsabschnitten 14, 16,
22, 24, 30, 31, 32, 33, 34, 35 und 36 Ventile (schematisch
dargestellt) vorgesehen. Die Ventile können beispielsweise
mechanisch betätigt werden oder aber vorzugsweise unter Ver-
wendung einer nicht dargestellten Steuereinrichtung elektrisch
15 bzw. elektronisch vorzugsweise automatisch angesteuert werden.

Im folgenden wird anhand der Figuren 1 bis 16 das Funk-
tionsschema des erfindungsgemäßen Verfahrens mit der vorste-
hend beschriebenen Kulturapparatur 2 näher erläutert. Dazu ist
20 anzumerken, daß abgesperrte Leitungsabschnitte dünn und
durchströmte bzw. durchströmbare Leitungsabschnitte oder Lei-
tungen dick eingezeichnet sind. Die Ventile sind lediglich
schematisch dargestellt, so daß aufgrund ihrer Darstel-
lungsform kein Rückschluß auf die verwendete Ventilart gemacht
25 werden sollte. Ebenso ist der Leitungsplan sowie die Ventil-
anordnung lediglich schematisch. Geeignete Ventile sowie die
bestmögliche Leitungsführung sowie Ventilanordnung können je
30 nach Anwendungsfall variieren.

Die Figuren 1 bis 16 stellen die wichtigsten aufeinanderfol-
genden Etappen im Kultivierungs/Sterilisierungszyklus dar.
35 Gemäß Fig. 1 befindet sich die Zellsuspension unter vor-
gewähltem Kulturregime (Chemostat, Turbidostat) im ersten Kul-
turgefäß 4. Die Ventile sind dabei so angesteuert, daß das er-

1 ste Kulturgefäß 4 sowohl mit der Gasversorgung 12 wie auch mit
der Mediumsquelle 18 in Verbindung steht, um der Kultur 38 re-
gelmäßig Flüssigkeiten, wie z.B. Nährmedien und Waschlösungen
5 nachzuliefern und eine kontinuierliche Versorgung mit sterilen
Gasen, wie z.B. Luft, zu gewährleisten. Die Verbindung des er-
sten Kulturgefäßes 4 zur Quelle 20 für das sterilisierende
Agens 21 ist durch das entsprechende Ventil unterbrochen. Das
zweite Kulturgefäß 6 hat eine Verbindung zur Gasquelle 12.
10 Durch die Leitung 36 kann die Kultur 38 oder Teile davon ent-
nommen werden.

Entsprechend Fig. 2 ist die Kultur 38 über die Leitungen 32,
15 34, 35 und 33 in das zweite Kulturgefäß 6 überführt worden,
wobei das Öffnen der Leitung 28 einen Druckausgleich gewähr-
leistet. Alle von der Mediumsquelle 18 und der Quelle 20 des
sterilisierenden Agens zu den Kulturgefäßen 4 und 6 führenden
20 Leitungen sind abgesperrt.

In der in Fig. 3 dargestellten Situation ist nach Absperren
der Leitungen 32, 34, 35 und 33 und Öffnen der Leitungen 22
und 26 das erste Kulturgefäß 4 mit sterilisierendem Agens 21
25 gefüllt worden; ein Überschuß an sterilisierendem Agens 21
wird über die Ablaßleitung 26 abgeführt. Die Kultur 38 im
zweiten Kulturgefäß 6 kann nach Herstellung der Verbindung 16
zwischen der Mediumsquelle 18 und dem Kulturgefäß 6 sowie Ab-
sperren der Leitung 28 und Öffnen der Leitungsabschnitte 31,
30 33, 35 und 36 wieder regelmäßig mit Medium versorgt werden.

Fig. 4 zeigt die Sterilisierung der Leitungen 30, 34 und 36
durch sterilisierendes Agens 21 nach Öffnen der entsprechenden
35 Leitungsabschnitte und Schließen der Ablaßleitung 26.

1 Das sterilisierende Agens 21 wird nun gemäß Fig. 5 nach Absperren der Leitungen 22, 26 und 30 sowie Öffnen der Leitung 32 aus dem ersten Kulturgefäß 4 entfernt.

5 Die Figuren 6 bis 8 zeigen vorzugsweise optionale Schritte zur Entfernung und Neutralisierung von eventuell verbliebenen Resten des sterilisierenden Agens 21 aus dem ersten Kulturgefäß 4 und den dazugehörigen Leitungsabschnitten durch frisches
10 Medium:

In Fig. 6 wird das erste Kulturgefäß 4 nach Schließen der Leitungen 32 und 36 und Öffnen der Leitung 26 durch Öffnen der
15 Leitung 14 mit Medium gefüllt, überschüssiges Medium wird durch die Ablaßleitung 26 abgeführt. Analog der Situation in Fig. 4 werden nun die Leitungen 30, 34 und 36 mit Medium durchspült (Fig. 7), um dann das Medium analog der Situation in Fig. 5 aus dem Kulturgefäß zu entfernen (Fig. 8).

20 Nach dem Öffnen der Leitung 26 und Schließen der Leitungen 32 und 34 des Kulturgefäßes 4 ergibt sich eine Situation, die der in Fig. 1 dargestellten spiegelsymmetrisch ist, wobei sich die Zellsuspension nun im zweiten Kulturgefäß 6 befindet. Durch
25 die Leitung 36 kann die Kultur 38 oder Teile davon entnommen werden.

30 Die Figuren 10 bis 16 stellen die entsprechenden symmetrischen Schritte dar, um zur Ausgangssituation in Fig. 1 zurückzu-
kehren, nämlich: Fig. 10, Überführung der Kultur 38 aus dem zweiten Kulturgefäß 6 in das erste Kulturgefäß 4; Fig. 11, Sterilisieren des zweiten Kulturgefäßes 6 mit sterilisierendem
35 Agens 21; Fig. 12, Sterilisieren der Leitungsabschnitte 31, 35 und 36; Fig. 13, Entfernen des sterilisierenden Agens 21 über die Leitungsabschnitte 33, 35 und 36; Fig. 14, Waschen des

1 Kulturgefäßes 6 und der Abblaßleitung 28 mit frischem Medium;
Fig. 15, Waschen der Leitungen 31, 35 und 36 durch frisches
Medium und Fig. 16, Entfernen des zum Waschen verwendeten Me-
5 diums über die Leitungen 33, 35 und 36. Öffnen der Leitung 14
zum Kulturgefäß 4, Öffnen der Leitungen 30 und 34 und
Schließen der Leitungen 26 sowie Öffnen der Leitung 28 und
Schließen der Leitungsabschnitte 33 und 35 stellt die Aus-
gangssituation von Fig. 1 wieder her.

10 Anzumerken ist, daß zu jedem Zeitpunkt des vorstehend
beschriebenen Verfahrens, zu dem die Abblaßleitung 36 nicht von
sterilisierendem Agens durchströmt wird, ein Abführen der Kul-
15 tur 38 durch den jeweiligen Verbindungsabschnitt und die
Abblaßleitung 36 gewährleistet ist.

20 Des weiteren ist die vorliegende Erfindung nicht auf die Ver-
wendung zweier Kulturgefäße 4 und 6 beschränkt, sondern es
können auch mehrere Kulturgefäße, z.B. in Serienschaltung
und/oder in Parallelschaltung angeordnet sein, so daß mehrere
erste Kulturgefäße 4_i und mehrere zweite Kulturgefäße 6_i
vorhanden sind.

25 In einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung
wäre es möglich, außer dem ersten und zweiten Kulturgefäß
mindestens ein weiteres Kulturgefäß vorzusehen, um z.B. ein
bereits verwendetes sterilisierendes Agens 21, das jedoch
30 nochmals verwendet werden könnte, zwischenzuspeichern. Auch
für etwaige Zwischenschritte wäre es denkbar, ein weiteres
Kulturgefäß vorzusehen.

P a t e n t a n s p r ü c h e

1. Vorrichtung zur Selektion beschleunigter Proliferation lebender Zellen in Suspension mit:
 - (a) mindestens einem ersten und mindestens einem zweiten Kulturgefäß (4, 6) zur Aufnahme einer Kultur (38);
 - (b) einer Gasquelle (12);
 - (c) einer Mediumsquelle (18);
 - (d) einer Quelle (20) für ein sterilisierendes Agens (21); und
 - (e) einem Leitungssystem mit Mitteln zum wahlweisen Verbinden eines der beiden Kulturgefäße (4 oder 6) mit der Mediumsquelle (18) sowie der beiden Kulturgefäße (4, 6) miteinander und zum wahlweisen Verbinden des entsprechend anderen Kulturgefäßes (4 oder 6) mit der Quelle (20) für das sterilisierende Agens (21).
2. Vorrichtung nach Anspruch 1, wobei die Mittel zum wahlweisen Verbinden Ventile sind.
3. Vorrichtung nach Anspruch 1 oder 2, wobei zwischen den beiden Kulturgefäßen (4, 6) zwei Verbindungsleitungen (30, 32) vorgesehen sind, die einen gemeinsamen Leitungsabschnitt (34) aufweisen.
4. Vorrichtung nach Anspruch 3, wobei am gemeinsamen Leitungsabschnitt (34) eine Ablaßleitung (36) vorgesehen ist, durch die Kulturen (38) aus den Kulturgefäßen (4, 6) entnehmbar sind.
5. Vorrichtung nach Anspruch 3 oder 4, wobei eine der Verbindungsleitungen (32) an einem unteren Bereich der Kulturgefäße (4, 6) und die andere der Verbindungsleitungen

- 1 (30) an einem oberen Bereich der Kulturgefäße (4, 6)
angeschlossen ist.
- 5 6. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei Lei-
tungen (14, 16) von der Mediumsquelle (18) und/oder Lei-
tungen (22, 24) von der Quelle (20) für das sterilisie-
rende Agens (21) in jeweils eine dem jeweiligen Kulturge-
fäß (4, 6) zugeordnete, von der Gasquelle (12) kommende
10 Leitung (8, 10) münden.
7. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei die
Leitungen des Leitungssystems, die mit der Gasquelle (12),
15 der Mediumsquelle (18) und/oder der Quelle (20) in Ver-
bindung stehen, unter Überdruck stehen.
8. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei eine
eigene, absperrbare Abbläuleitung (26, 28) für jedes der
20 Kulturgefäße (4, 6) vorgesehen ist.
9. Vorrichtung nach Anspruch 8, wobei die Abbläuleitungen (26,
28) aus dem oberen Bereich der Kulturgefäße (4, 6) münden
25 und/oder von der Verbindungsleitung (30) abzweigen.
10. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 9, wobei die
Mittel zum Verbinden der Leitungen des Leitungssystems
elektrisch und/oder elektronisch ansteuerbar sind.
30
11. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 10, wobei
mehrere erste Kulturgefäße (4_i) und/oder mehrere zweite
Kulturgefäße (6_i) in Parallelschaltung vorgesehen sind.
35
12. Verfahren zur Selektion beschleunigter Proliferation le-
bender Zellen in Suspension mit den Schritten:

- 1 (a) Bereitstellen einer Kultur (38) in mindestens einem
ersten Kulturgefäß (4);
- 5 (b) kontinuierliches Versorgen der Kultur (38) im ersten
Kulturgefäß (4) mit Gas von einer Gasquelle (12) und
regelmäßiges Nachliefern von Flüssigkeiten von einer
Mediumsquelle (18);
- 10 (c) Überführen der Kultur (38) aus dem ersten Kulturgefäß
(4) durch Verbindungsleitungen (32 - 35) in mindestens
ein zweites Kulturgefäß (6) mittels entsprechender
Leitungsschaltung;
- 15 (d) Verbinden des ersten Kulturgefäßes (4) mit einer
Quelle (20) für ein sterilisierendes Agens (21), um
das erste Kulturgefäß (4) zu sterilisieren;
- (e) Entfernen des sterilisierenden Agens (21) aus dem er-
sten Kulturgefäß (4);
- 20 (f) kontinuierliches Versorgen der Kultur (38) im zweiten
Kulturgefäß (6) mit Gas von der Gasquelle (12) und re-
gelmäßiges Nachliefern von Flüssigkeiten von der Medi-
umsquelle (18);
- 25 (g) Rückführen der Kultur (38) aus dem zweiten Kulturgefäß
(6) durch die Verbindungsleitungen (32 - 35) in das
erste Kulturgefäß (4) mittels entsprechender Lei-
tungsschaltung;
- 30 (h) Verbinden des zweiten Kulturgefäßes (6) mit der Quelle
(20) für das sterilisierende Agens (21), um das zweite
Kulturgefäß (6) zu sterilisieren;
- (i) Entfernen des sterilisierenden Agens (21) aus dem
zweiten Kulturgefäß (6);
- (j) gegebenenfalls Wiederholen der Schritte (b) bis (h).

35 13. Verfahren nach Anspruch 12, wobei die dem jeweiligen Kul-
turgefäß (4, 6) zugeordneten Leitungsabschnitte durch ent-
sprechende Leitungsschaltung sterilisiert werden.

- 1
14. Verfahren nach Anspruch 12 oder 13, wobei Reste des sterilisierenden Agens (21) in den Leitungsabschnitten oder dem Kulturgefäß (4, 6) nach der Sterilisation neutralisiert werden.
- 5
15. Verfahren nach einem der Ansprüche 12 bis 14, wobei zu jedem Zeitpunkt, zu dem kein sterilisierendes Agens (21) abgeführt wird, Kulturen (38) aus der Kulturapparatur (2) abgeführt werden können.
- 10
16. Verfahren nach einem der Ansprüche 12 bis 15, wobei die Überführung der Kulturen (38) von einem Kulturgefäß (4 oder 6) in das andere Kulturgefäß (4 oder 6) periodisch erfolgt.
- 15
17. Verfahren nach einem der Ansprüche 12 bis 15, wobei das Überführen der Kulturen (38) von einem Kulturgefäß (4 oder 6) in das andere Kulturgefäß (4 oder 6) in solchen Intervallen erfolgt, daß die Population von Organismen in Suspension zu jedem Zeitpunkt erhalten bleibt und alle verdünnungsresistenten Varianten in irgendeinem Teil der Apparatur während jedem dieser Zyklen zerstört werden.
- 20
18. Verfahren nach einem der Ansprüche 12 bis 17, wobei die Leitungsschaltung durch Ventile erfolgt.
- 25
19. Verfahren nach einem der Ansprüche 12 bis 18, wobei die Leitungsschaltung durch elektrisch und/oder elektronisch ansteuerbare Verbindungsmittel erfolgt, die mit einer Steuereinrichtung in Verbindung stehen.
- 30
- 35

1 20. Verfahren nach einem der Ansprüche 12 bis 19, wobei die
der Kultur (38) zugeführte Flüssigkeit Nährmedien und/oder
Waschlösungen aufweist.

5 21. Verfahren nach einem der Ansprüche 12 bis 20, wobei das
Entfernen des sterilisierenden Agens (21) zumindest teil-
weise durch den Kulturgefäßen (4, 6) zugeordnete Abblaßlei-
tungen (26, 28) erfolgt.

10 22. Verfahren nach einem der Ansprüche 12 bis 21, wobei minde-
stens zwei der Schritte (b) bis (h) zeitüberlappend oder
zeitgleich durchgeführt werden.

15 23. Verfahren nach einem der Ansprüche 12 bis 22, wobei die
Sterilisierung durch NaOH erfolgt.

20

25

30

35

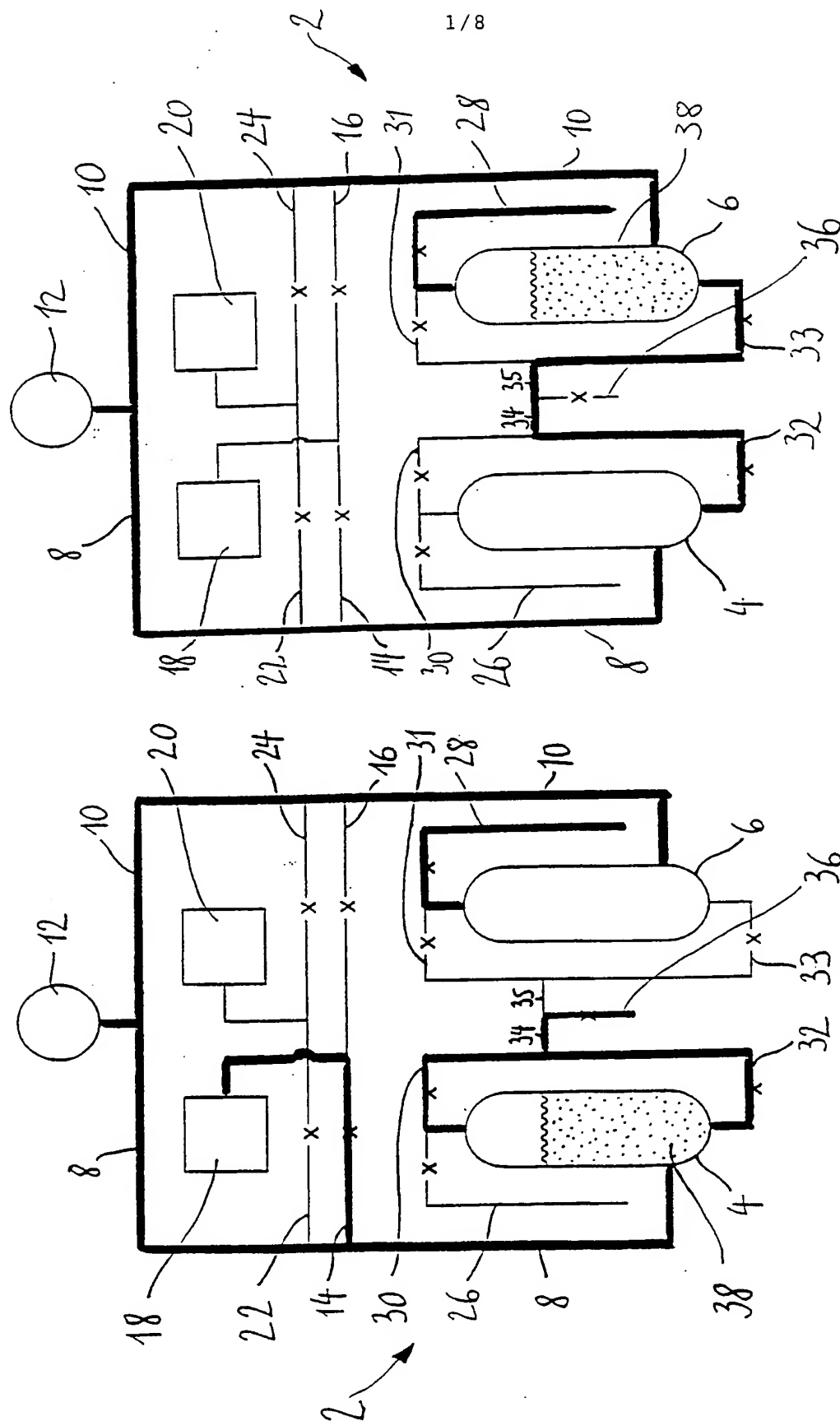


Fig. 2

Fig. 1

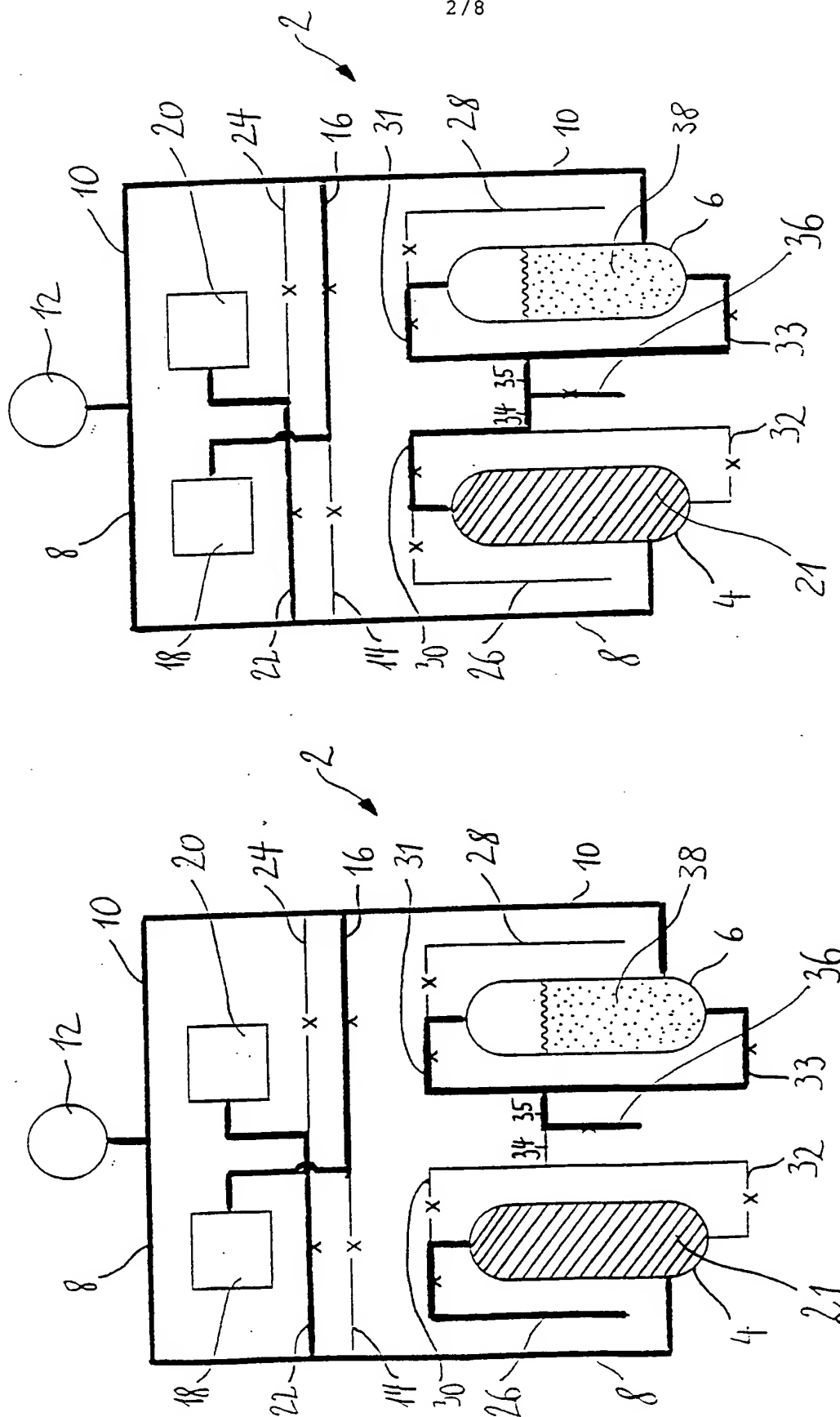


Fig. 4

Fig. 3

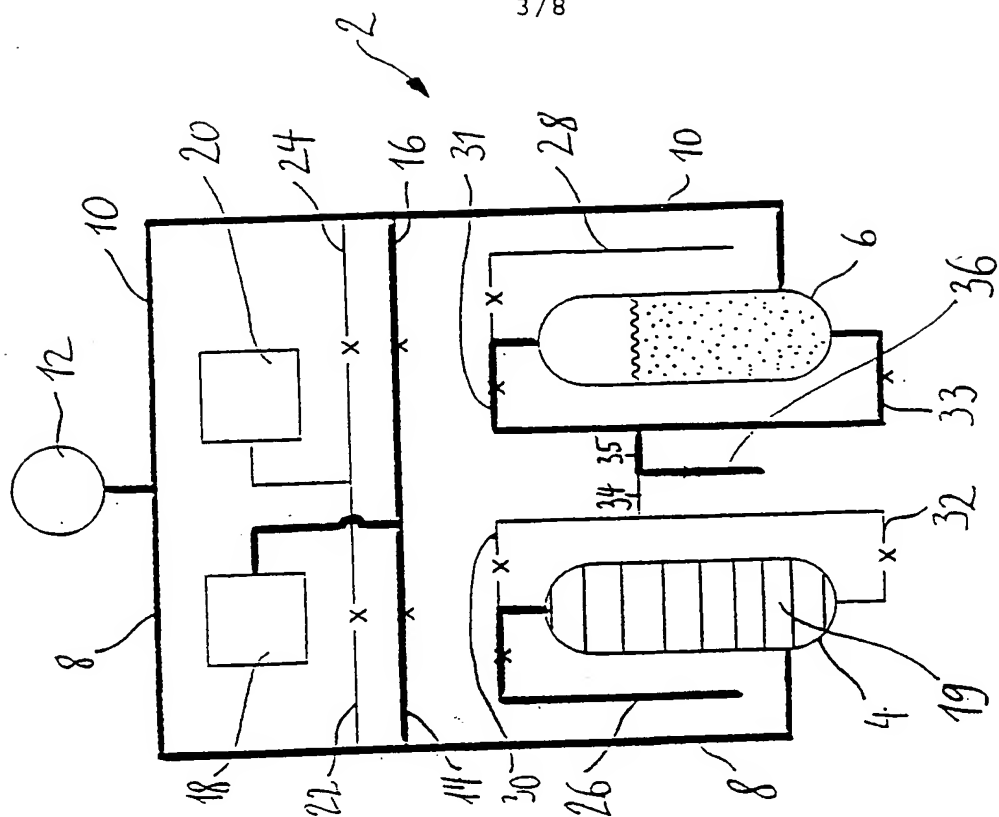


Fig. 6

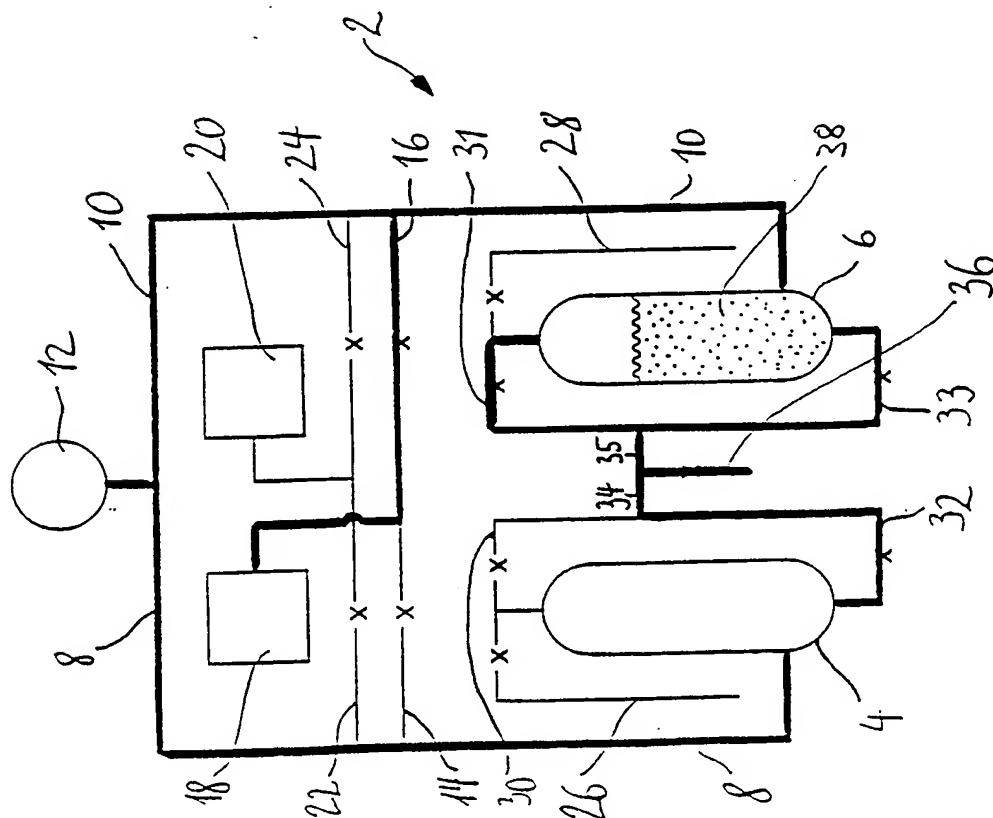


Fig. 5

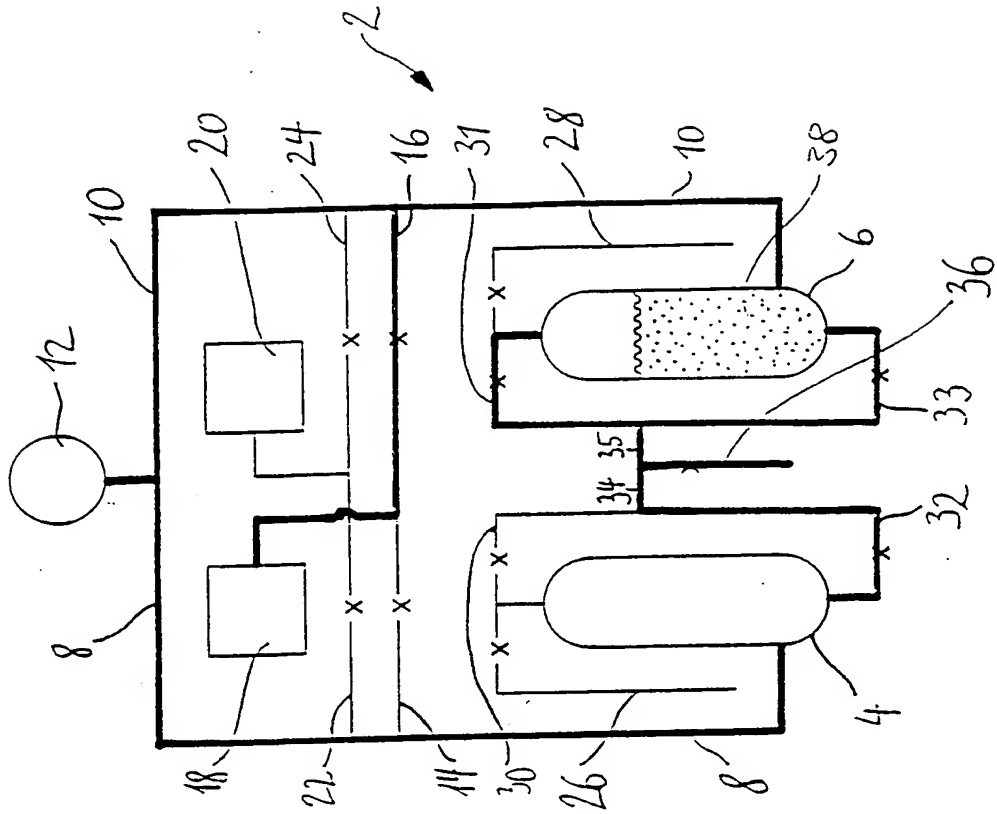


Fig. 8

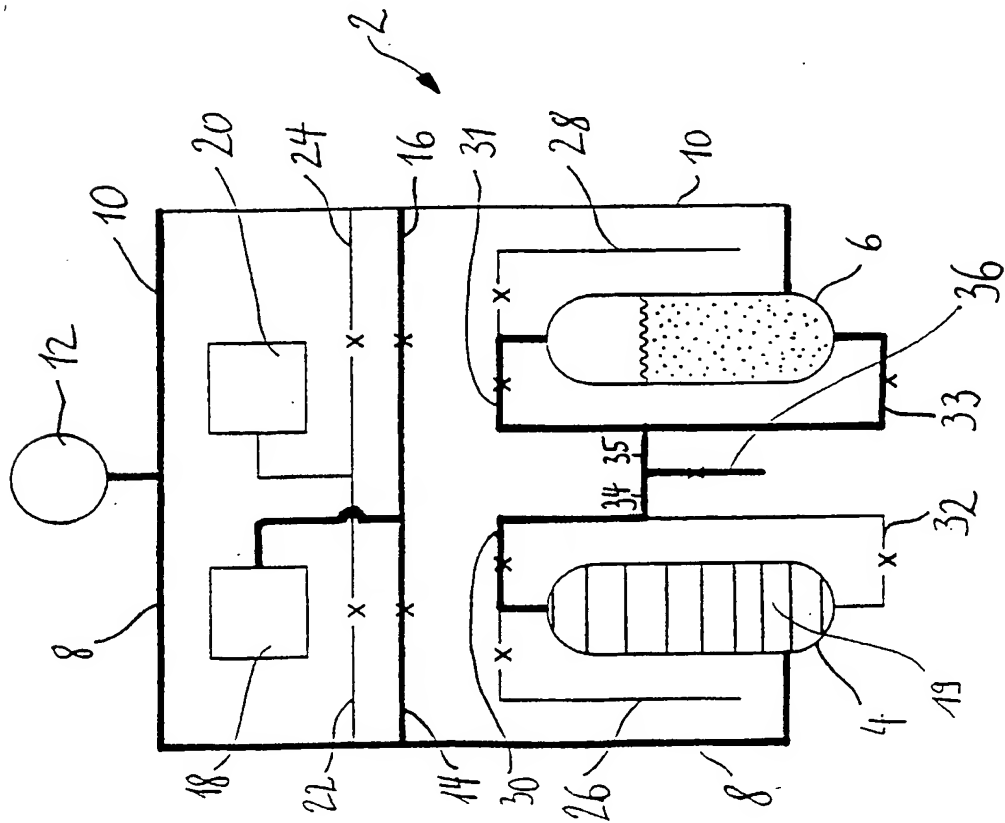
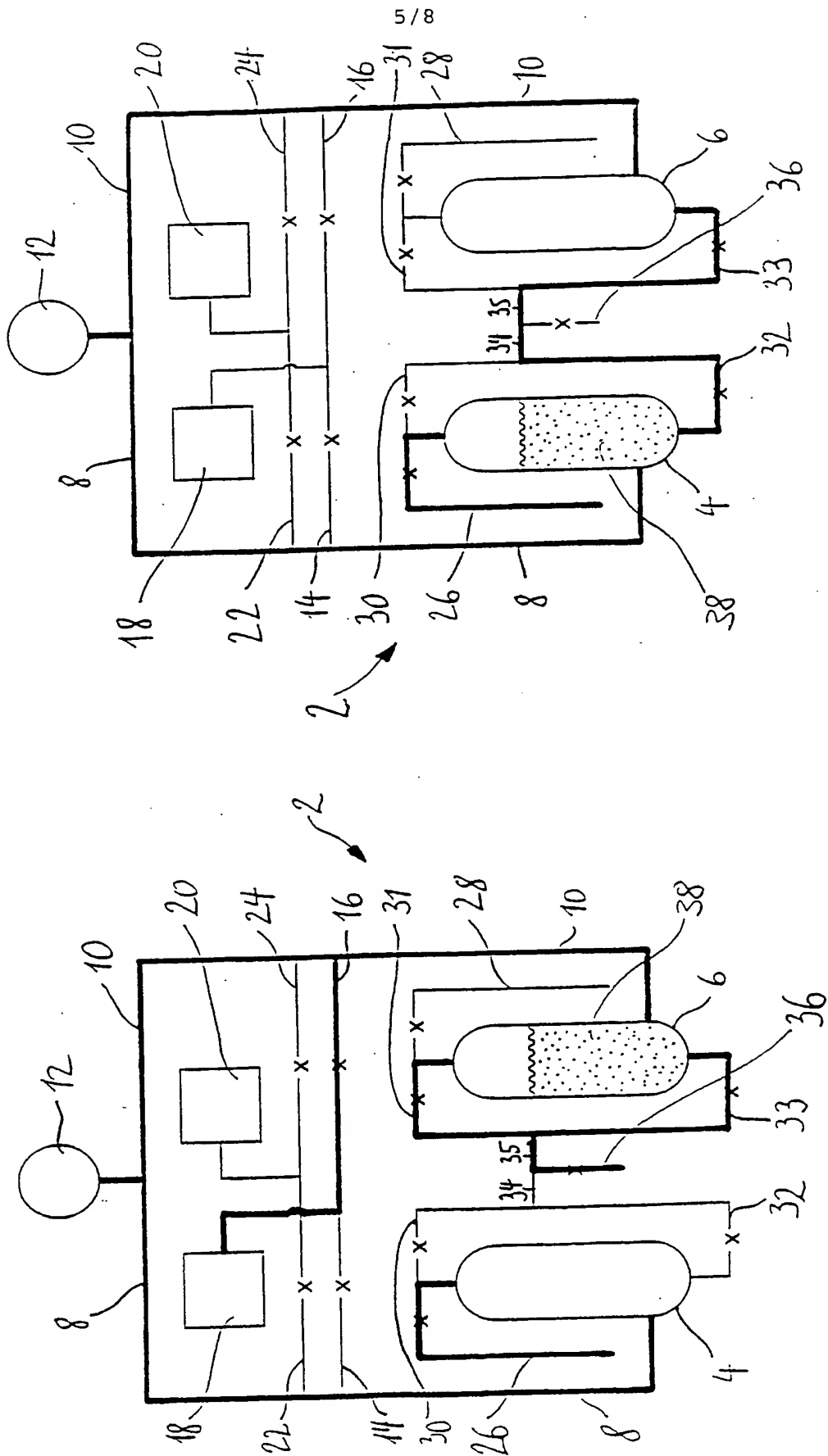


Fig. 7



6/8

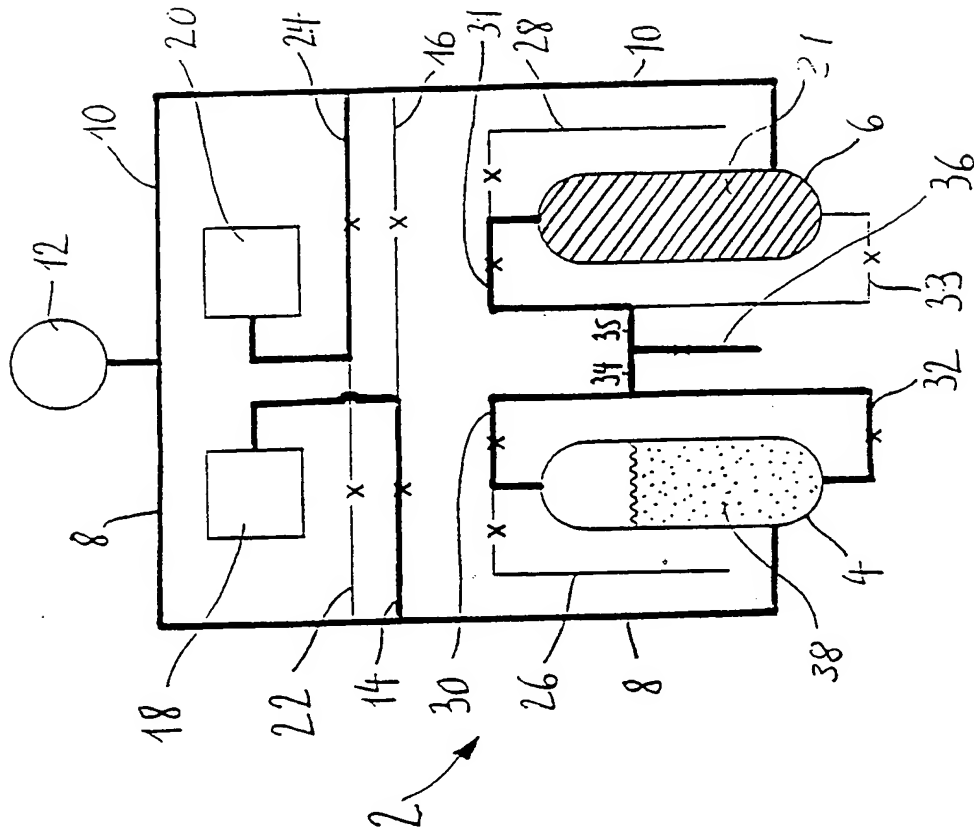


Fig. 12

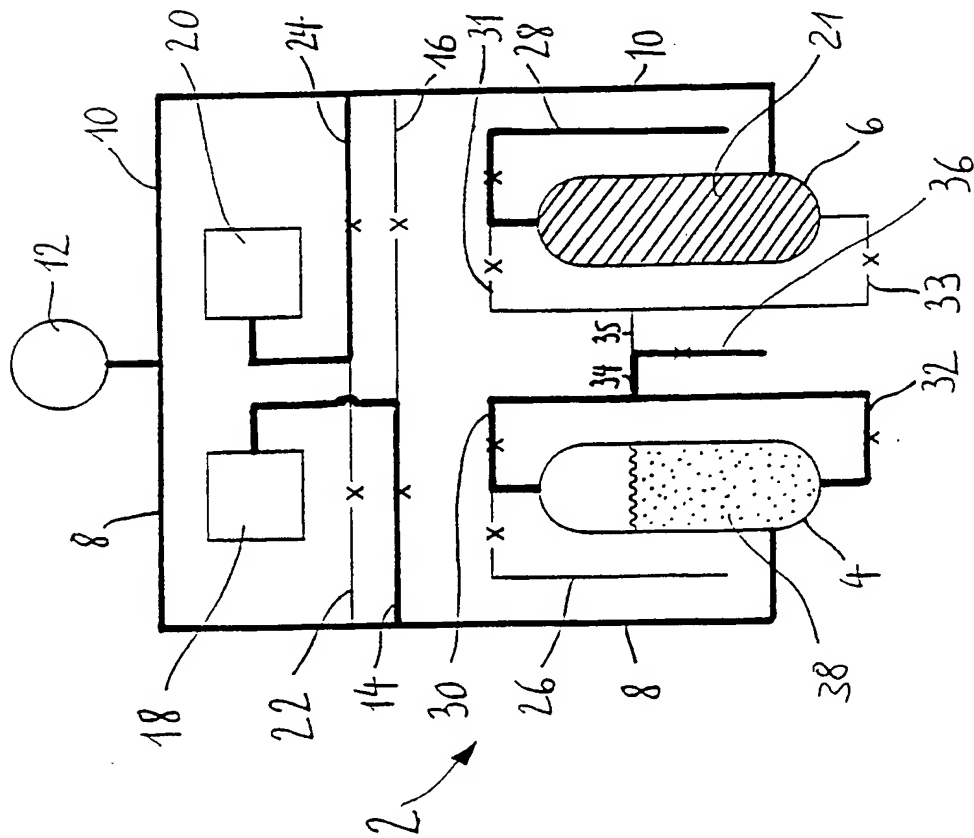
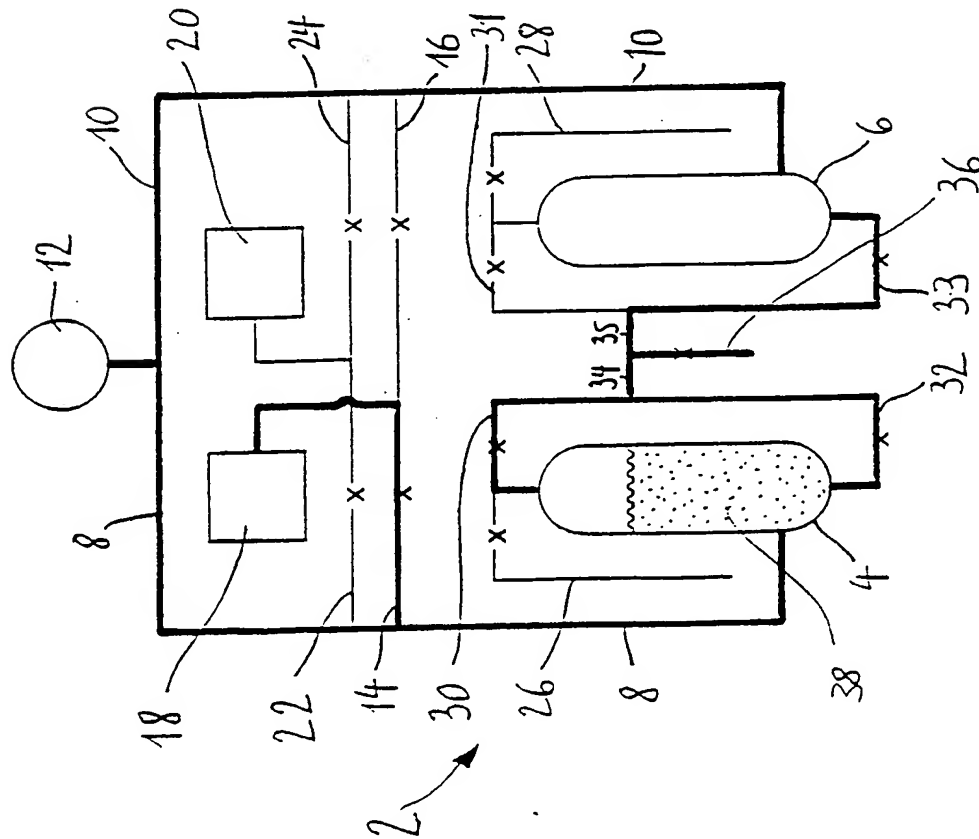
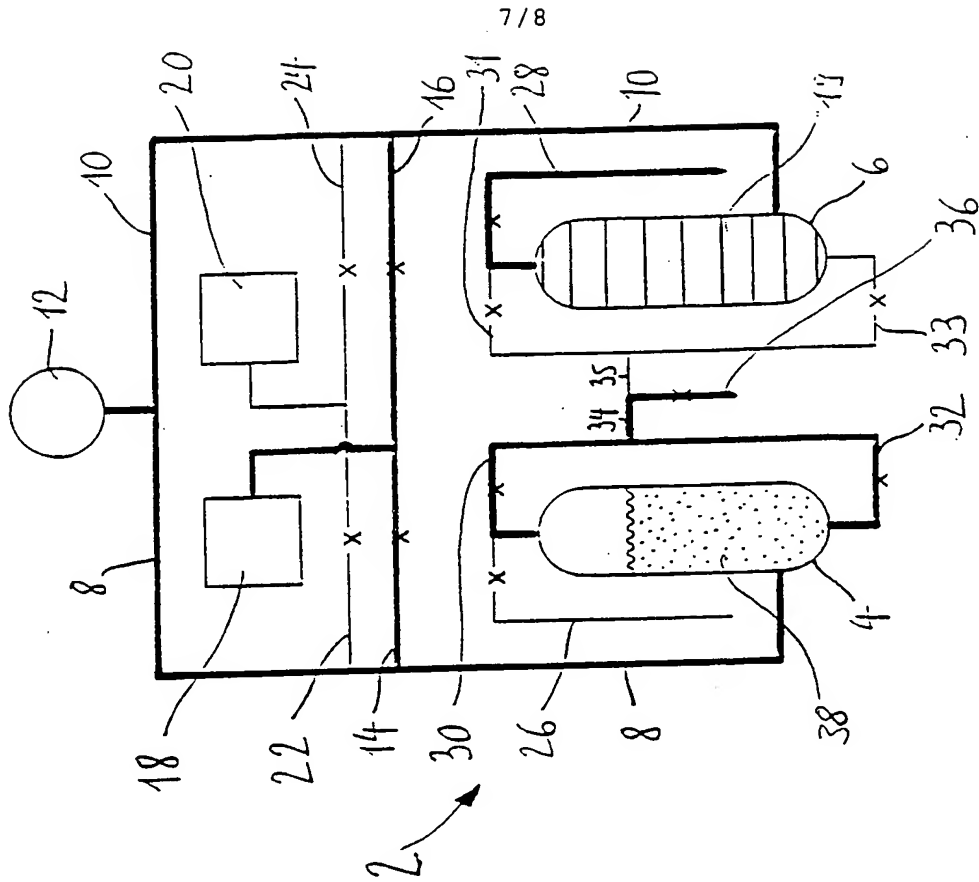


Fig. 11



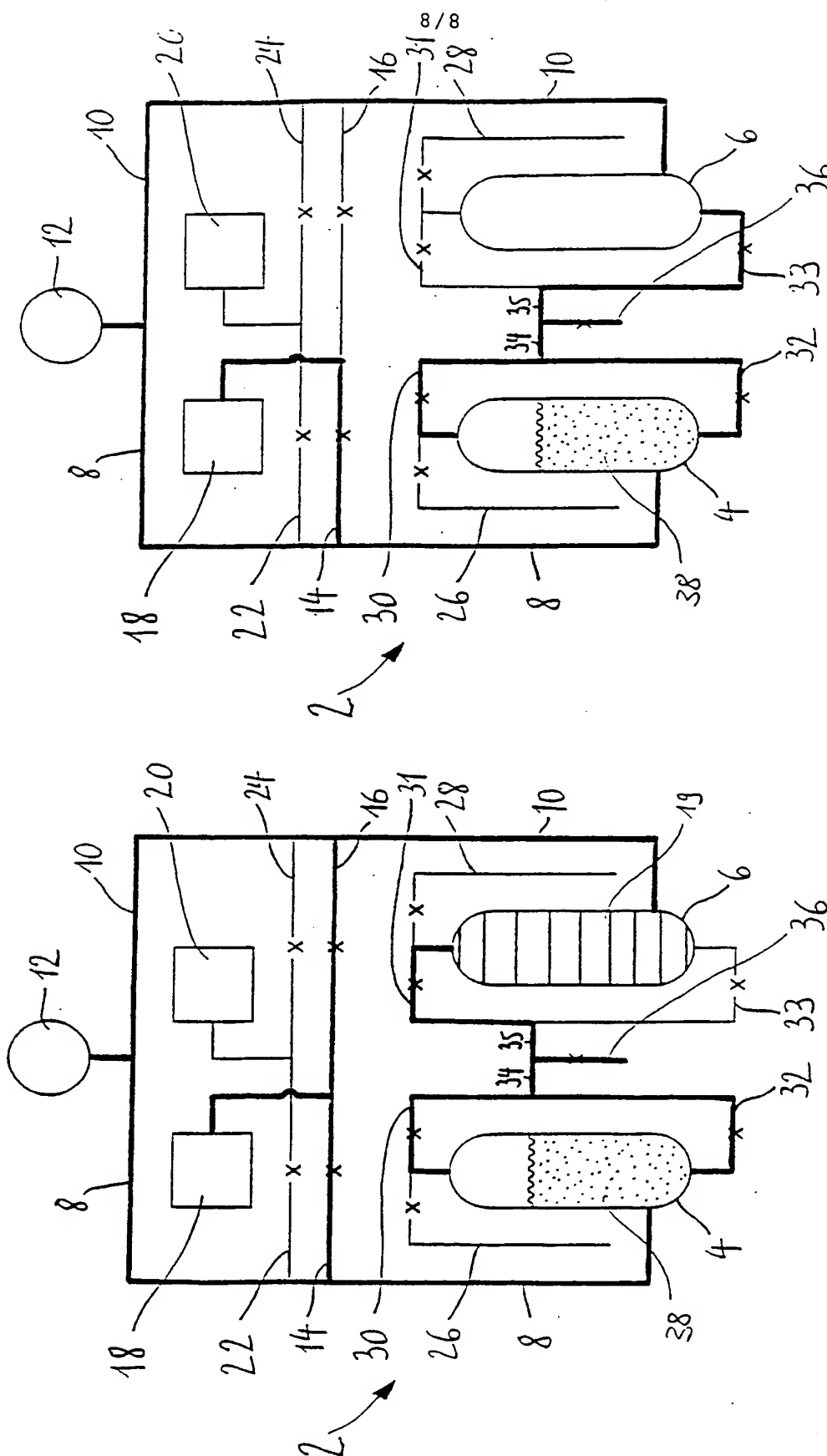


Fig. 15

Fig. 16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 99/09422

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12M1/34 C12M1/12

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12M

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C12M EP0-Internal WPI PAJ BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2 147 271 A (R. SCHWARZ) 14 February 1939 (1939-02-14) page 1, column 2, line 13 -page 3, column 1, line 67; claims; figure	1-11
A	WYSS C: "SELECTED LOW-COHESION VARIANTS OF ACTINOBACILLUS-ACTINOMYCETEMCOMITANS AND HAEMOPHILUS-APHROPHILUS LACK DISTINCT ANTIGENS RECOGNIZED BY HUMAN ANTIBODIES" ARCHIVES OF MICROBIOLOGY 1989, vol. 151, no. 2, 1989, pages 133-136, XP002136552 ISSN: 0302-8933 abstract	1
A	EP 0 620 273 A (GAZ DE FRANCE) 19 October 1994 (1994-10-19) -/-	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

A document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 April 2000

Date of mailing of the international search report

12/05/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Coucke, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 99/09422

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	FR 1 064 614 A (F. SCH, MIDT ET AL.) 17 May 1954 (1954-05-17) abstract; figures	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 99/09422

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2147271 A	14-02-1939	NONE	
EP 0620273 A	19-10-1994	FR 2702764 A AT 188732 T DE 69422542 D NO 940909 A OA 9894 A	23-09-1994 15-01-2000 17-02-2000 20-09-1994 15-09-1994
FR 1064614 A	17-05-1954	NONE	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationa. Aktenzeichen

PCT/EP 99/09422

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12M1/34 C12M1/12

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12M

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C12M EP0-Internal WPI PAJ BIOSIS

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 2 147 271 A (R. SCHWARZ) 14. Februar 1939 (1939-02-14) Seite 1, Spalte 2, Zeile 13 -Seite 3, Spalte 1, Zeile 67; Ansprüche; Abbildung	1-11
A	WYSS C: "SELECTED LOW-COHESION VARIANTS OF ACTINOBACILLUS-ACTINOMYCETEMCOMITANS AND HAEMOPHILUS-APHROPHILUS LACK DISTINCT ANTIGENS RECOGNIZED BY HUMAN ANTIBODIES" ARCHIVES OF MICROBIOLOGY 1989, Bd. 151, Nr. 2, 1989, Seiten 133-136, XP002136552 ISSN: 0302-8933 Zusammenfassung	1
A	EP 0 620 273 A (GAZ DE FRANCE) 19. Oktober 1994 (1994-10-19)	
	-/-	



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

27. April 2000

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

12/05/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Coucke, A

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

International Patentzeichen

PCT/EP 99/09422

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	FR 1 064 614 A (F. SCH, MIDT ET AL.) 17. Mai 1954 (1954-05-17) Zusammenfassung; Abbildungen	1

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationale .enzeichen

PCT/EP 99/09422

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 2147271	A	14-02-1939	KEINE	
EP 0620273	A	19-10-1994	FR 2702764 A	23-09-1994
			AT 188732 T	15-01-2000
			DE 69422542 D	17-02-2000
			NO 940909 A	20-09-1994
			OA 9894 A	15-09-1994
FR 1064614	A	17-05-1954	KEINE	